

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 03/08259

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

29.07.03 ~~X~~<sup>2</sup>

REC'D 12 SEP 2003

WIPO PAT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年    6 月 2 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 1 8 9 5 3 4  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 1 8 9 5 3 4 ]

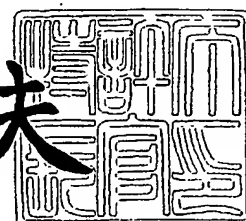
出      願      人                      扶 桑 薬 品 工 業 株 式 会 社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年    8 月 2 8 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 2002PA0255

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A61P 31/18

【発明者】

    【住所又は居所】 北海道旭川市東光五条十丁目 1-4

    【氏名】 若宮 伸隆

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮 2 丁目 3 番 30 号 扶桑薬品  
工業株式会社 研究開発センター内

    【氏名】 大谷 克城

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮 2 丁目 3 番 30 号 扶桑薬品  
工業株式会社 研究開発センター内

    【氏名】 坂本 隆志

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮 2 丁目 3 番 30 号 扶桑薬品  
工業株式会社 研究開発センター内

    【氏名】 芥子 宏行

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮 2 丁目 3 番 30 号 扶桑薬品  
工業株式会社 研究開発センター内

    【氏名】 岸 雄一郎

【特許出願人】

    【識別番号】 000238201

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100065868

【弁理士】

【氏名又は名称】 角田 嘉宏

【電話番号】 078-321-8822

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100088960

【弁理士】

【氏名又は名称】 高石 ▲さとり▼

【電話番号】 078-321-8822

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100106242

【弁理士】

【氏名又は名称】 古川 安航

【電話番号】 078-321-8822

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006220

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705390

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗H I V剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 マンノース結合タンパク質を有効成分とする抗H I V剤。

【請求項 2】 前記マンノース結合タンパク質が、H I Vに対する増殖抑制作用を有する請求項 1 に記載の抗H I V剤。

【請求項 3】 前記増殖抑制作用が、H I Vに対する中和作用である請求項 2 に記載の抗H I V剤。

【請求項 4】 前記増殖抑制作用が、H I Vに対する発芽抑制作用である請求項 2 に記載の抗H I V剤。

【請求項 5】 前記マンノース結合タンパク質が、ヒト血清から単離および精製されたタンパク質である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗H I V剤。

【請求項 6】 前記マンノース結合タンパク質が、動物細胞から遺伝子工学的に分泌されたタンパク質である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗H I V剤。

【請求項 7】 前記動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巢（C H O）細胞である請求項 6 に記載の抗H I V剤。

【請求項 8】 前記H I Vが、H I Vタイプ 1 のグループMのサブタイプB に属する請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗H I V剤。

【請求項 9】 前記H I Vが、組換え型流行株である請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の抗H I V剤。

【請求項 1 0】 前記組換え型流行株が、CRF01\_\_AEである請求項 9 に記載の抗H I V剤。

【請求項 1 1】 マンノース結合タンパク質による抗H I V作用の評価方法であって、以下の工程、すなわち；

- (1) 感染標的細胞にH I Vを添加してH I V感染細胞を得、
- (2) H I V感染細胞を培養し、
- (3) 培養したH I V感染細胞を洗浄し、
- (4) 洗浄したH I V感染細胞にマンノース結合タンパク質を添加し、

(5) マンノース結合タンパク質を添加したH I V感染細胞を培養し、

(6) H I V由来の p 24蛋白を測定する、

工程を含む、ことを特徴とするマンノース結合タンパク質による抗H I V作用の評価方法。

【請求項 1 2】 前記抗H I V作用が、H I Vに対する増殖抑制作用である請求項11に記載の評価方法。

【請求項 1 3】 前記H I Vが、H I Vタイプ1のグループMのサブタイプBに属する請求項11または12に記載の評価方法。

【請求項 1 4】 前記H I Vが、組換え型流行株である請求項11乃至13のいずれかに記載の評価方法。

【請求項 1 5】 前記組換え型流行株が、CRF01\_\_AEである請求項14に記載の評価方法。

【請求項 1 6】 請求項11乃至15のいずれかに記載の評価方法によって決定された抗H I V作用を有するマンノース結合タンパク質。

【請求項 1 7】 請求項11乃至15のいずれかに記載の評価方法によって決定されたH I V増殖抑制作用を有するマンノース結合タンパク質。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、マンノース結合タンパク質(MBP)の治療用途、特に、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus (HIV)) が原因となる感染症に対するMBPの新規用途に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

MBPは、マンナン結合タンパク質、マンナン結合レクチン、マンノース結合レクチンなどとも呼ばれている物質であって、その分子内部にコラーゲン様構造およびカルシウム要求性の糖認識領域を有するC型レクチン、すなわち、コレクチン(collectin)に属する物質である (Kozutsumi, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, pp.658-664 (1980))。

## 【0003】

図4を参照すれば、MBPは、一般に、そのN末端側からC末端側（図4の左端から右端）に向けて、N末端領域（システインリッチ領域）、コラーゲン様領域、ネック領域、および糖認識領域(CRD)の4つの領域から構成されている。そして、ネック領域およびコラーゲン様領域でのヘリックス構造によって、1本当たり約30kDa～約33kDaの3つのポリペプチドが分子間結合して、約90kDa～約99kDaの1つのサブユニット構造（3量体）が形成されている。そして、このサブユニット構造の2～6個が、さらにブーケ様に結合してホモオリゴマー構造を形成している。

## 【0004】

MBPに関するこれまでの基礎研究から、生体内に進入してきた微生物に対して、MBPは微生物表面の糖鎖に結合して、補体系を活性化させて、微生物感染の初期防御に関与していることが示唆されている（Holmskov, U. et al., Immunol. Today, 15, pp.67-74 (1994) および Turner, M. W. et al., Immunol. Today, 17, pp.532-540 (1996)）。それに加えて、MBPの欠損者では、感染症が起こりやすいこと（Summerfield, J. A. et al., Lancet, 345, pp.886-889 (1995)）、動脈硬化性アテローム患者にMBP欠損者が多いこと（Madsen, H. O. et al., Lancet, 352, pp.959-960 (1998)）、MBP遺伝子変異によって重症マラリアになりやすいこと（Luty, A. J. et al., J. Infect. Dis., 178, pp.1221-1224 (1998)）、それに、MBP遺伝子変異により嚢胞性線維症において肺での感染症を重症化させること（Garred, P. et al., J. Clin. Invest., 104, pp.431-437 (1999)）、などがこれまでに報告されている。

## 【0005】

さらに、MBPの治療薬用途に向けた検討として、MBP欠損患者にMBPを投与することで、補体依存性のオプソニン活性の正常化が起こり、易感染性が改善されることが報告されている（Valdimarsson, H. et al., Scand. J. Immunol., 48, pp.116-123 (1998)）。また、嚢胞性繊維症の患者にMBPを投与したところ、患者の臨床症状は安定化したことも報告されている（Garred, P. et al., Pediatr. Pulmonol., 33(3), pp.201-207 (2002)）。

## 【0006】

ところで、HIVの感染者数は世界規模で年々増加し続けており、その多くは、発展途上国で発生しており、これらの地域では、後天性免疫不全症候群(AIDS)患者の急増という事態を招いている。特に、タイ国のクレイドE型(サブタイプE型)と呼ばれるウイルスは、極めて感染力が高く、世界保健機構(WHO)では、サブタイプE型のウイルスによる感染者が、今後、世界で最も多くなると予測している。

## 【0007】

日本では、欧米と同様に、サブタイプB型の感染者が多かったが、最近になって、サブタイプE型の感染者も増加する傾向にある。

## 【0008】

HIV感染症に効果的に対応するには、新規の感染者数の発生を予防すること、すなわち、ワクチンの開発が緊急の課題とされている。とりわけ、米国やフランスなどでは、ワクチンの研究が積極的に進められているが、現在研究中のワクチンはサブタイプB型ウイルスに対処するものであって、サブタイプE型に対するワクチンの研究は、未だほとんどなされていないのが現状である。

## 【0009】

また、エイズ(AIDS)ワクチンには、エイズウイルスの粒子をそのまま使う生ワクチン、ウイルス粒子の一部を用いるコンポーネントワクチン、ウイルス遺伝子の組換えを行って得たりコンビナントワクチン、ウイルスを死滅させてその蛋白構造のみを保った死菌ワクチンなどが研究されている。しかしながら、それらの実用性を考慮すると、HIV感染の防御効果、すなわち、有効性(免疫能の誘導)とともに、その安全性をも考慮する必要がある。

## 【0010】

現在のところ、AIDSの治療においては、多剤併用療法(HAART)がよく使われている。

## 【0011】

HAART療法が提唱された当時は、画期的な化学療法と言われたが、現在では、薬剤耐性ウイルスの出現、HIVの高度ゲノム変異、長期および大量服用による副

作用などの問題が認知されたこともあって、使用する薬剤の選択および使用方法が極めて複雑になってきている。

#### 【0012】

HIVは、高度のゲノム多様性を有するウイルスであり、その原因は、主として2つあると考えられている。

#### 【0013】

まず第一に、HIVゲノムの複製エラーによる多様性の増大が挙げられる。ゲノムRNAから逆転写酵素によってDNAが作られ、その後、宿主細胞ゲノムに組み込まれるという複製過程をとっている。逆転写酵素は、3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を欠いているため、複製された塩基配列に対する校正機能を有していない。また、逆転写酵素の基質特異性が低いので、逆転写反応の際に塩基の置換、欠失、挿入、重複などの変異が、極めて高頻度に発生する (Mansky, L. M., J. Gen. Virol., 79, pp.1337-1345 (1998))。さらに、HIVは、生体内で $10^9$ - $10^{10}$ /日の割合で増殖し (Perelson, A. S. et al., Science, 271, pp.1582-1586 (1996))、年間300サイクルの複製が繰り返されていると考えられている。従って、HIVに感染すると同時に変異の蓄積がはじまり、さらなるゲノム多様性が生じることとなる。

#### 【0014】

一方で、異系統のウイルス間の遺伝子組換えによる多様性の増大が挙げられる。

#### 【0015】

HIVが属するレトロウイルスの遺伝学的組換えは、通常、ウイルス粒子内への相同性のある2つのRNAゲノムの取り込みと、逆転写酵素による鋳型乗り換え (template switch) 機能によって奏する強制コピー選択 (forced copy choice) (Coffin, J. M., J. Gen. Virol., 42, pp. 1-26 (1979)) と称するメカニズムとによって、高頻度に生じることが知られている (Jetzt, A. E. et al., J. Virol., 74, pp.1234-1240 (2000))。従って、このような高度のゲノム多様性を獲得することで、HIVの準種性、サブタイプの分化、組換えウイルスの出現、薬剤耐性変異、CTLエスケープ変異などを引き起こすものと考えられている。



## 【0016】

HIVは、遺伝学的系統によって、HIVタイプ1 (HIV-1) とHIVタイプ2 (HIV-2) の2種に大別され、HIV-1はさらにグループM、グループO、およびグループNに分類される。

## 【0017】

グループMは、HIV-1の中で最も主要なグループであり、サブタイプA～D、F～H、JおよびKの9種に分類されている。サブタイプAおよびFは、それぞれ、サブサブタイプA、A2およびF1、F2にさらに分類されている。

## 【0018】

なお、サブタイプEは、現在のところ、CRF01\_AEとして分類されつつあるので、本明細書では、サブタイプEを、「CRF01\_AE」として記載している。

## 【0019】

一方で、HIV-2は、サブタイプA～Gに分類されている (Charneau, P. et al., *Virology*, 205, pp.247-253 (1994); Gurtler, L. G. et al., *J. Virol.*, 68, pp.1581-1585 (1994); Simon, F. et al., *Nat. Med.*, 4, pp.1032-1037 (1998); Triques, K. et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16, pp.139-151 (2000); Robertson, D. L. et al., *Science*, 288, pp.55-56 (2000); Triques, K. et al., *Virology*, 259, pp.99-109 (1999))。

## 【0020】

また、HIVの組換えウイルスの分類として、組換え型流行株 (CRFs: CRF01～CRF12)、孤立型組換えウイルス (URFs: URFsA/C、URFsA/D、URFsB/E、URFsB/C)、帰属不明の組換えウイルス (MAL株)、グループM/O間組換えウイルスなどが報告されている (Carr, J. K. et al., *Virology*, 247, pp.22-31 (1998); Motomura, K. et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16, pp.1831-1843 (2000); Peeters, M. et al., *J. Virol.*, 73, pp.7368-7375 (1999); Takehisa, J. et al., *J. Virol.*, 73, pp.6810-6820 (1999); 武部豊 日本ウイルス学会雑誌, 50(2), pp.123-138 (2001))。

## 【0021】

HIVの糖蛋白質として、エンベロープ糖蛋白質であるgp120と、膜貫通糖蛋白質

であるgp41がある。これら糖蛋白質は、ウイルスゲノム状の「env」と称する遺伝子でコードされたgp160が、宿主のプロテアーゼで切断されて生じる (Hallenberger, S. et al., Nature, 360, pp.358-361 (1992))。

#### 【0022】

gp120には、N-結合型糖鎖結合部位が24箇所存在し (Leonard, C. K. et al., J. Biol. Chem., 265, pp.10373-10382 (1990))、糖鎖はgp120分子の約半分を占めている (Allans, J. S. et al., Science, 228, pp.1091-1094 (1985)) ので、HIVは糖鎖で覆われたウイルスであるといえる。HIVの標的細胞への感染には、gp120の糖鎖が必要であることが種々の実験により証明されている (Fennie, C. et al., J. Virol., 63, pp.639-646 (1989); Matthews, T. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp.5424-5428 (1987); Montefiori, D. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp.9248-9252 (1988); Pal, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, pp.3384-3388 (1989))。そして、役割は定かではないが、高マンノース型糖鎖が、HIVの感染において重要であるという報告もされている (水落次男; 日本臨床, 50, pp.1419-1429 (1992))。

#### 【0023】

特に、MBPとHIVとの関係については、MBPのホモ遺伝子変異を有するヒトにおいてHIVの感染のリスクが高く、また、AIDS診断後の生存期間が短いことが報告されている (Garred, P. et al., Lancet, 349, pp.236-240 (1997))。しかし、その後、逆に遺伝子変異のあるグループの方がAIDSに移行しにくいという報告 (Mass, J. et al., Aids, 12, pp.2275-2280 (1998)) がされたり、遺伝子変異とAIDSの予後とは関係ないという報告 (McBride, M. O. et al., Int. J. STD. AIDS., 9, pp.683-688 (1998)) もされている。さらに、MBPが、gp120と結合することが報告されている (Larkin, M. et al., AIDS, 3, pp.793-798 (1989)); Mizuochi, T. et al., J. Biol. Chem., 264, pp.13834-13839 (1989); Saifuddin, M. et al., J. Gen. Virol., 81, pp.949-955 (2000))。

#### 【0024】

しかしながら、MBPによる抗HIV作用の有無、それに、MBPによるHIV増殖抑制作用の有無については全く不明であった。このことは、MBPを抗HIV剤として利用

する上での有用性を判定する際の最も重要な要素であるにもかかわらず、これまで、一切証明されていなかった。 また、MBPの抗HIV作用を評価できる評価系も無かったため、MBPを利用した抗HIV剤の開発が進展していない状況にあった。

#### 【0025】

また、HIVを薬剤治療するにあたって懸念される薬剤耐性ウイルスの出現、HIVの高度ゲノム変異、長期および大量服用による副作用などの問題が未解決のままである。 さらに、ワクチンの開発も困難を極め、特に、サブタイプEの研究は全く進んでいないのが実情である。

#### 【0026】

それゆえ、臨床医からは上記した一連の問題を回避でき、しかも、安全でかつHIVウイルスのサブタイプに関係なく抗HIV作用を示す薬剤の開発が切望されているのである。

#### 【0027】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、上記従来技術で指摘されていた問題点に鑑みて発明されたものであり、とりわけ、本発明者(ら)は、MBPの抗HIV作用を定量可能な評価系を初めて確立し、その評価系を利用することで、MBPの抗HIV作用(HIV増殖抑制作用)を初めて証明して、抗HIV剤としてのMBPの用途を切り開いたのである。 また、本発明者(ら)は、MBPが、サブタイプE型のHIVは勿論、その他のクレイド(サブタイプ)に属するHIVに対しても抗HIV作用を示すことを証明した。

#### 【0028】

すなわち、本発明の要旨とするところは；

1. マンノース結合タンパク質(MBP)を有効成分とする抗HIV剤；
2. MBPが、HIVの増殖抑制作用を有する1に記載の抗HIV剤；
3. 当該増殖抑制作用が、HIVの中和作用である2に記載の抗HIV剤；
4. 当該増殖抑制作用が、HIVの発芽抑制作用である2に記載の抗HIV剤；
5. 当該マンノース結合タンパク質が、ヒト血清から単離および精製されたタンパク質である1乃至4のいずれかに記載の抗HIV剤；
6. 当該マンノース結合タンパク質が、動物細胞から遺伝子工学的に分泌され

たタンパク質である 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗HIV剤；

7. 当該動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である 6 に記載の抗HIV剤；

8. 当該HIVが、HIVタイプ 1 のグループMのサブタイプBに属する 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗HIV剤；

9. 当該HIVが、組換え型流行株である 1 乃至 8 のいずれかに記載の抗HIV剤。

【0029】

10. 当該組換え型流行株が、CRF01\_\_AEである 9 に記載の抗HIV剤；

11. マンノース結合タンパク質による抗HIV作用の評価方法であって、以下の工程、すなわち；

- (1) 感染標的細胞にHIVを添加してHIV感染細胞を得、
- (2) HIV感染細胞を培養し、
- (3) 培養したHIV感染細胞を洗浄し、
- (4) 洗浄したHIV感染細胞にマンノース結合タンパク質を添加し、
- (5) マンノース結合タンパク質を添加したHIV感染細胞を培養し、
- (6) HIV由来の p 24蛋白を測定する、

工程を含むMBPによる抗HIV作用の評価方法；

12. 当該抗HIV作用が、HIVの増殖抑制作用である11に記載の評価方法；

13. 当該HIVが、HIVタイプ 1 のグループMのサブタイプBに属する11または12に記載の評価方法；

14. 当該HIVが、組換え型流行株である11乃至13のいずれかに記載の評価方法；

15. 当該組換え型流行株が、CRF01\_\_AEである14に記載の評価方法；

16. 11乃至15のいずれかに記載の評価方法によって決定された抗HIV作用を有するマンノース結合タンパク質、および

17. 11乃至15のいずれかに記載の評価方法によって決定されたHIV増殖抑制作用を有するマンノース結合タンパク質、にある。

【0030】

マンノース結合タンパク質(MBP)を有効成分とする本発明の抗HIV剤は、MBPの

標的が糖鎖であるため、HIVゲノム変異によるMBP耐性株の出現による影響を受けにくい点で有利である。また、MBPは、生体に常在する物質であるため、従来の化学療法に使用される化合物のような副作用は生じないという利点を持つ。

#### 【0031】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の抗HIV剤は、AIDS患者およびHIV感染者の治療および病態進行の抑制に有用である。

#### 【0032】

本発明の抗HIV剤を、AIDS治療剤またはHIV感染の病態進行抑制剤として用いる場合、タンパク質が吸収されるような剤型および投与経路（静脈内投与など）を選択するのが好ましい。例えば、本発明の医薬組成物の投与方法として、静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、経口投与などが適宜選択でき、その投与方法に応じて、種々の形態の製剤として用いることができる。以下に、静脈投与製剤について記載するが、本発明において用いられる剤型は、これらに限定されるものではなく、医薬製剤分野において通常用いられる各種製剤が利用することができる。

#### 【0033】

日本人（479例）におけるMBPの遺伝子変異および血中MBP濃度を検討したところ、MBPの遺伝子変異は、コドン54（GGC→GAC）にのみ認められ、各ジェノタイプの比率は、Wild/Wildで70.8%、Wild/mutantで22.5%、mutant/mutantで6.7%であることが報告されている。また、血中MBP濃度は、Wild/Wildで0.18～4.35  $\mu\text{g/ml}$ （平均1.26  $\mu\text{g/ml}$ ）、Wild/mutantで0.00～0.80  $\mu\text{g/ml}$ （平均0.23  $\mu\text{g/ml}$ ）、mutant/mutanatで0.00～0.20  $\mu\text{g/ml}$ （平均0.04  $\mu\text{g/ml}$ ）であることも報告されている（芥子宏行ら、医学のあゆみ、194(12), pp.957-958 (2000)）。

#### 【0034】

本発明の抗HIV剤を、AIDS治療剤またはHIV感染後の病態進行抑制剤として用いる場合、本発明の抗HIV剤の静脈内投与量は、健常人の血中MBP濃度が約1  $\mu\text{g/ml}$ ～約1.5  $\mu\text{g/ml}$ であるので、血中MBP濃度をELISAなどの手法により測定した後、C型肝炎などの肝障害によりMBPの産生量が低下したり、あるいは遺伝子変異に

よって血中濃度が低い場合には、まずは、血中MBP濃度を約  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約  $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  となるように投与量を決定してもよい。そして、HIV-RNA量およびCD4陽性細胞数を定期的にモニタリングし、モニタリングの結果とMBP投与量との関係を把握した上で、有効血中MBP濃度値を決定する必要がある。血中MBP濃度が正常値であれば、徐々に血中濃度を高くして（例えば、約  $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約  $5.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ ）、HIV-RNA量およびCD4陽性細胞数を定期的にモニタリングし、モニタリングの結果とMBP投与量との関係を把握した上で、有効血中MBP濃度値を決定すればよい。

#### 【0035】

MBPの有効血中濃度は、個人が生来有する血中MBP濃度に左右されるため一定するものではないが、好ましくは、約  $1.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、より好ましくは、約  $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ と設定するのが好ましいが、投与直前または投与直後の血中濃度はこれらの範囲外であってもよい。さらに、遺伝子変異により血中MBP濃度の低下が認められることから、MBPの投与量は、遺伝子変異も考慮して決定すべきである。

#### 【0036】

また、その剤型（経口投与剤、注射剤、座剤等の公知の剤型）に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤等の添加剤を製剤原料として加えて製造することができる。

#### 【0037】

このような添加剤の具体例を、以下に例示するが、本願発明の添加剤が、以下の例示物質に限定されるものではない。

##### [溶 剤]

精製水、注射用水、生理食塩水、ラッカセイ油、エタノール、グリセリン。

##### [賦形剤]

デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトール。

##### [コーティング剤]

白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロース、および上記した高分子類。

## [基 剤]

ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤

。

## [結合剤]

デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴム等の天然高分子化合物、ポリビニルピロリドン等の合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ

。

## [滑沢剤]

ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、コムギデンプン、マクロゴール、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール。

## [崩壊剤]

デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロース。

## [溶解補助剤]

シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール。

## [懸濁化剤]

アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤。

## [粘稠剤]

カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム。

## [乳化剤]

アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチン。

## [安定剤]

亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質。

## [緩衝剤]

リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸。

## [等張化剤]

塩化ナトリウム、ブドウ糖。

## [無痛化剤]

塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコール。

## [保存剤]

安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサール。

## [矯味剤]

白糖、サッカリン、カンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリン。

## [芳香剤]

トウヒチンキ、ローズ油。

## [着色剤]

水溶性食用色素、レーキ色素。

## 【0038】

本発明の抗HIV剤には、上掲した成分以外にも、製薬上許容される塩を含有せしめることも可能である。製薬上許容される塩としては、例えば、無機塩基、有機塩基等の塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩等が挙げられる。

## 【0039】

無機塩基としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム、アンモニウム等が挙げられる。有機塩基としては、例えば、エタノールアミン等の第一級アミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベン



ジリエチレンジアミン等の第二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミン等の第三級アミン等が挙げられる。

#### 【0040】

また、無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられる。また、有機酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられる。そして、塩基性アミノ酸としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等が挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

#### 【0041】

##### 【実施例】

マンノース結合タンパク質 (MBP) による抗HIV活性を検討した。

#### 【0042】

まず、HIV株として、HIV-NDK実験株 (サブタイプB; 以下、単に「NDK」と称する) と、組換え型流行株CRF01\_AE (臨床分離株; 以下、単に「LP65」と称する) とを準備した。なお、NDKは、米国国立衛生研究所 (NIH) のAIDS Research and Reference Regent Programより入手可能な株である。

#### 【0043】

次に、これらHIV株で、フィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin(PHA)) でblast化したヒト末梢血単核球 (ヒトPBMC; 以下、単に「PBMC」と称する) とT細胞系の株化細胞M8166 (以下、単に「M8166」と称する) を、それぞれ感染させた。また、M8166も、米国国立衛生研究所 (NIH) のAIDS Research and Reference Regent Programより入手可能な株である。

#### 【0044】

ところで、MBPとしては、ヒト血液より精製した天然型MBPと、特開平11-206378号に記載の方法により合成された組換え型MBPとを用いた。

#### 【0045】

劇症型ウイルスであるNDKを、PBMCおよびM8166にそれぞれ添加し、これらを、37℃で、1時間培養して感染させて得られた感染株を、それぞれNDK/PBMCおよびNDK/M8166と称する。また、LP65を、PBMCおよびM8166にそれぞれ添加し、これらを37℃で、1時間培養することによってHIV感染させた。なお、NDKおよびLP65ともに、 $5 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞に対して、100 TCID<sub>50</sub>のウイルスを加えた。得られた感染株を、それぞれ「LP65/PBMC」および「LP65/M8166」と命名した。

#### 【0046】

その後、感染させた細胞を、PBSで2回洗浄した。次に、4種のウイルス感染細胞（NDK/PBMC、NDK/M8166、LP65/PBMC、LP65/M8166）に、天然型MBPまたは組換え型MBPを、1～100  $\mu$ g/mlの濃度（図1）または1～30  $\mu$ g/mlの濃度（図2～3）で添加した。この時の細胞の濃度は、200  $\mu$ lの系内での $1 \times 10^6$ 細胞/mlの系の濃度（すなわち、 $2 \times 10^5$ 細胞/200  $\mu$ l）である。つまり、1/5規模の200  $\mu$ lの系内に、MBP 1～100  $\mu$ g/ $1 \times 10^6$ 細胞/mlまたはMBP 1～30  $\mu$ g/ $1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度の細胞を置き、これをヒト血清添加培地で、37℃、5%炭酸ガス存在下、1週間培養した。培養後のウイルス量の変化の指標として、培養上清中のHIV由来のp24抗原量をELISAを用いて測定し、MBP非添加群と比較した。

#### 【0047】

なお、HIV p24抗原は、全自動化学発光酵素免疫測定システム（ルミパルス f：富士レビオ社製）を用いて測定した。

#### 【0048】

その結果、図3に記載のグラフにあるように、天然型MBP添加群にてHIV量の抑制が認められた。しかしながら、図1に記載のグラフから見てとれる通り、NDK/M8166については、組換え型MBP(rMBP)濃度が10  $\mu$ g/ml～30  $\mu$ g/mlでは、培養上清中のp24抗原量が、培養後速やかに組換え型MBP非添加群の約50%にまで抑制されていたことが確認された。また、図2に記載のグラフから明らかなように、臨床分離株LP65（HIV-1の組換え型流行株CRF01\_AE）についても、組換え型MBPは、LP65を濃度依存的に中和するIC<sub>50</sub>が、約10  $\mu$ g/mlの濃度で抗HIV効果が認められ、つまり、その中和作用はサブタイプに関係なく認められた。

#### 【0049】

また、使用したMBP濃度範囲においては、天然型MBPおよび組換え型MBPともに、細胞に対する顕著な増殖抑制や細胞毒性は認められなかった。

#### 【0050】

#### 【発明の効果】

このように、本発明によると、活性の中和が最も困難とされている組換え型流行株CRF01\_AEウイルスを初めとした多様なHIV株に対して中和活性を示す抗HIV剤が提供されるのである。 マンノース結合タンパク質(MBP)を有効成分とする本発明の抗HIV剤は、糖鎖を標的にするため、HIVゲノム変異によるMBP耐性株の出現が懸念されず、また、MBP自体が生体内に常在するため、HIV治療に従来より用いられてきた化合物に見られるような副作用の問題とも無縁である、などの優れた作用効果を奏するのである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 HIV感染細胞NDK/M8166における組換え型マンノース結合タンパク質(rMBP)とHIV活性との相関を示すグラフである。

【図2】 HIV感染細胞LP65/M8166における組換え型マンノース結合タンパク質(rMBP)とHIV活性との相関を示すグラフである。

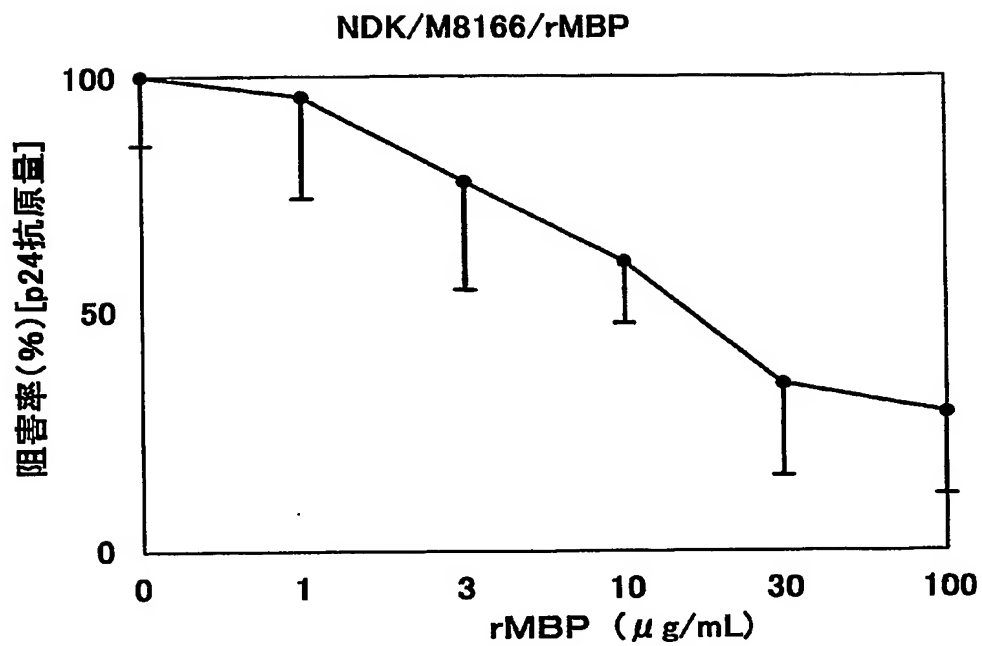
【図3】 HIV感染細胞NDK/M8166における天然型マンノース結合タンパク質(native MBP)とHIV活性との相関を示すグラフである。

【図4】 マンノース結合タンパク質の構造を示す概略図である。

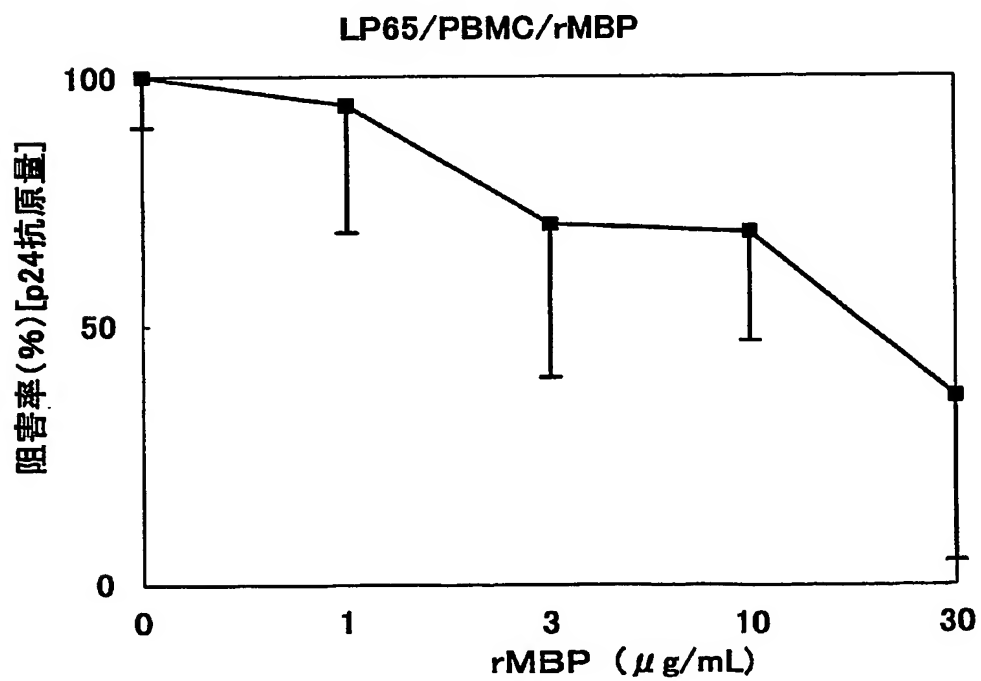
【書類名】

図面

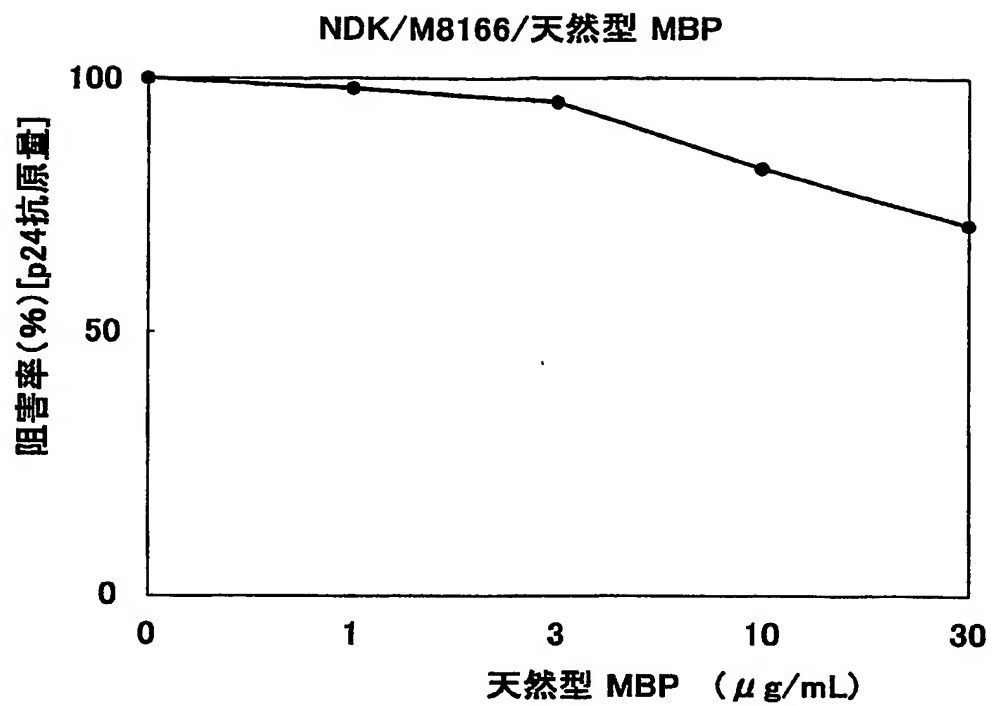
【図 1】



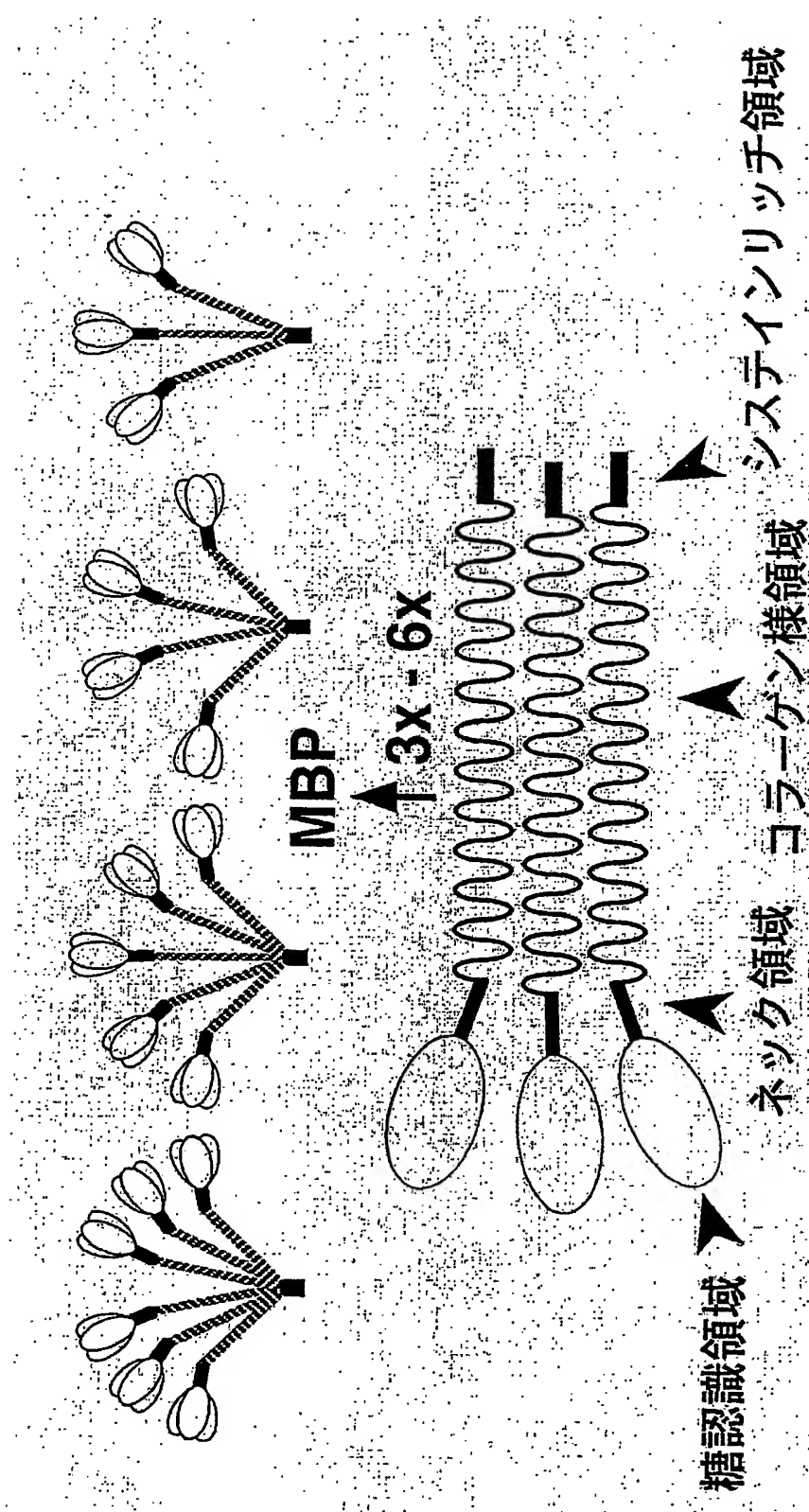
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 AIDS患者およびHIV感染者の治療および病態進行の抑制に有用な抗HIV剤を提供する。

【解決手段】 マンノース結合タンパク質(MBP)を有効成分とする抗HIV剤、そして、HIV感染細胞にMBPを添加および培養する工程を含むMBPが保有する抗HIV活性の評価方法。 MBP、特に、組換え型マンノース結合タンパク質(rMBP)は、HIV感染細胞(NDK/M8166)に対して優れたHIV中和活性を示した。

【選択図】 図 1

## 認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2002-189534  
受付番号 50200950208  
書類名 特許願  
担当官 第四担当上席 0093  
作成日 平成14年 7月 1日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】 平成14年 6月28日  
【特許出願人】  
【識別番号】 000238201  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号  
【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100065868  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所  
【氏名又は名称】 角田 嘉宏  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100088960  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所  
【氏名又は名称】 高石 ▲さとり▼  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100106242  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所  
【氏名又は名称】 古川 安航

次頁無



特願 2002-189534

出願人履歴情報

識別番号

[000238201]

1. 変更年月日

1990年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

氏 名

扶桑薬品工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**